УДК 616.36:611.018.1:615.27.3

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИКЛОФОСФАМИДА

Молодых О.П., Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М., Бакулина А.А., Сорокина Ю.А.
НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН, Новосибирск,
e-mail: pathol@soramn.ru

Изучен характер ультраструктурной реорганизации гепатоцитов и других клеточных популяций печени после введения циклофосфамида. Показано, что однократное введение препарата вызывает выраженные ультраструктурные изменения двух основных клеточных популяций печени – гепатоцитов и эндотелиоцитов синусоидов, а также реактивные изменения мигрирующих в пространство Диссе клеток Купфера, лимфоцитов, плазмоцитов. Пространственная реорганизация гепатоцитов после воздействия циклофосфамидом определяется нарастающим снижением структурной плотности митохондрий, значительной редукцией гладкой цитоплазматической сети, усилением аутофагоцитоза, включая секвестрацию гликогена. Внутриклеточная реорганизация эндотелиоцитов обусловлена двумя факторами – повреждением (некробиозом) одних клеток и интенсификацией обменных процессов, усилением фагоцитоза и регенераторных реакций в других.

Ключевые слова: повреждение печени, гепатоциты, циклофосфамид, ультраструктура, стереология

SPATIAL REORGANIZATION OF HEPATOCYTE UNDER THE INFLUENCE OF CYCLOPHOSPHAMIDE

Molodykh O.P., Lushnikova E.L., Nepomnyashchikh L.M., Bakulina A.A., Sorokina Y.A.
Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology SD RAMS,
Novosibirsk, e-mail: pathol@soramn.ru

The character of the ultrastructural reorganization of hepatocytes and other cell populations of liver after administration of cyclophosphamide was studied. It is shown that one-fold treatment causes marked ultrastructural changes in two main cell populations of the liver – hepatocytes and endothelial sinusoid cells, as well as reactive changes in Kupffer cells, lymphocytes, plasmatic cells migrated into Disse space. Spatial reorganization of hepatocytes after exposure to cyclophosphamide is determined by progressive reduction of structural density of mitochondria, a significant reduction of volume density of smooth endtoplasmic reticulum, and intensufucation of autophagocytosis, including glycogen sequestration. Intracellular reorganization of endothelial cells caused by two factors – injury (necrobiosis) of the some cells and the intensification of metabolic processes, enhancement of phagocytosis and regeneration reactions in others cells.

Keywords: liver damage, hepatocytes, cyclophosphamide, ultrastructure, stereology

Циклофосфамид (ЦФ) – препарат, широко используемый в противоопухолевой терапии как оказывающий алкилирующее воздействие на ДНК и при трансплантации как индуктор толерантности [1, 4]. Отсутствие избирательности действия и выявляемые уро-, нефро- и кардиотоксические свойства ЦФ, его метаболитов, а также нарушения репродуктивной функции создают в ряде случаев серьезную проблему для клинического использования этого препарата [2, 9]. Наиболее полную и достоверную информацию о гепатотоксических эффектах противоопухолевых препаратов можно получить при моделировании этих процессов [1, 2, 8].

Для выяснения механизмов циклофосфамидного поражения гепатоцитов и других клеточных популяций печени необходимо изучение ультраструктурных изменений клеток с оценкой выраженности внутриклеточных регенераторных реакций, а также выяснение закономерностей и особенностей ремоделирования печени в этих условиях. Полученная информация имеет большое значение для разработки эффективных способов коррекции развивающихся побочных эффектов медикаментозной терапии.

Цель исследования – изучить ультраструктурные изменения и характер внутриклеточной реорганизации гепатоцитов и других клеточных популяций печени после однократного введения ЦФ.

Материал и методы исследования

Анализ ультраструктурной реорганизации печеночной дольки после введения ЦФ проведен у 4-месячных крыс-самцов линии Вистар ($n = 20$). Животным вводили однократно внутрибрюшинно ЦФ («Биохимик», Саранск) в дозе 125 мг/кг. Контрольную группу составили крысы ($n = 12$), которым одновременно с опытными особями однократно внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в соответствующем их массе тела объеме. Опытных и контрольных животных содержали постоянно при комнатной температуре без ограничения доступа к воде и пище, декапитировали с использованием эфирного наркоза через 3 и 14 сут после введения ЦФ.

Печень отделяли от окружающих тканей, быстро взвешивали. Образцы печени фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида, постфиксировали в 1%-м растворе четырехокиси осмия и обрабатывали по стандартной методике. Ультратонкие срезы контрастировали в уранилацетате и цитрате свинца

и использовали для ультраструктурного и стереологического анализа. Исследование проводили в электронном микроскопе JEM 1400 («Jeol», Япония), микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры Veleta и программного обеспечения iTEM («Olympus», Япония).

Ультраструктурный стереологический анализ гепатоцитов проводили с использованием программы iTEM при конечном увеличении в 23 500 раз (первоначальное увеличение 20 000 раз). Оценивали объемную плотность митохондрий, гранулярной цитоплазматической сети, липосом, лизосом и цитоплазмы с включениями, а также поверхностную плотность (относительную плотность поверхности) митохондрий, гранулярной цитоплазматической сети, липосом, лизосом. На основании первичных стереологических параметров рассчитывали вторичные, описывающие количественные взаимоотношения между основными ультраструктурами гепатоцита.

При статистической обработке результатов определяли средние значения параметров, вычисляли дисперсию и ошибки средних. Значимость различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Ультраструктура гепатоцитов перипортальной и перицентральной зон печеночной дольки у интактных крыс имеет ряд особенностей. В большинстве гепатоцитов перипортальной зоны содержится большое количество гранул гликогена, которые образовывают своеобразные «поля», расположенные между морфофункциональными комплексами, состоящими из митохондрий и цистерн гранулярной цитоплазматической сети. В гепатоцитах перицентральной зоны гранул гликогена меньше, хорошо развита гранулярная цитоплазматическая сеть, профили которой образовывают характерные морфофункциональные комплексы и равномерно распределены по клетке. В гепатоцитах обеих зон, как правило, хорошо развита агранулярная цитоплазматическая сеть, везикулы которой располагаются преимущественно в участках скопления гранул гликогена.

Ультраструктурные изменения печеночной дольки в динамике эксперимента после однократного введения ЦФ носили сходный характер, но для каждого срока наблюдения отмечалась различная степень выраженности. Через 3 сут после введения ЦФ особенности внутриклеточной организации гепатоцитов в перипортальной и перицентральной зонах сохранялись и усиливались. В гепатоцитах перипортальной зоны большую часть цитоплазмы занимали обширные «поля» гликогена. Митохондрии характеризовались умеренным полиморфизмом, отмечались конденсация матрикса отдельных органелл и деструкция крист. Цистерны гранулярной цитоплазматической сети часто образовывали футляры вокруг митохондрий и формировали протяженные, плотно упакованные стопки, особенно вблизи ядер. В некоторых гепатоцитах отмечалось неравномерное расширение и укорочение цистерн гранулярной цитоплазматической сети, объемная и поверхностная плотности которой умеренно возрастали (таблица). На синусоидальном полюсе располагались мелкие липидные капли, которые подвергались неравномерному истощению и миелиноподобной трансформации. На синусоидальных полюсах и вдоль латеральных мембран гепатоцитов также находились многочисленные остаточные тельца, которые выводились в пространство Диссе. Во всех гепатоцитах была значительно редуцирована агранулярная цитоплазматическая сеть, ее везикулы практически не выявлялись.

Гепатоциты перицентральной зоны содержали меньшее количество гликогена; большая часть цитоплазмы была занята митохондриями и многочисленными цистернами гранулярной цитоплазматической сети. В некоторых гепатоцитах субплазмалеммально также располагались небольшие липидные включения или вакуолеобразные остаточные тельца с хлопьевидным содержимым. Митохондрии во всех гепатоцитах содержали электронно-плотный матрикс, в котором плохо различались немногочисленные, иногда расширенные кристы. Деструктивные изменения митохондрий обусловливали умеренное снижение их объемной и поверхностной плотностей (см. таблицу).

Характерной особенностью внутриклеточной реорганизации гепатоцитов обеих зон через 3 сут после введения ЦФ были лизис и секвестрация гранул гликогена, которые регистрировались во всех клетках, но различались по интенсивности. В наибольшей степени эти процессы были выражены в гепатоцитах перипортальной зоны. Здесь отмечались образование светлого ободка вокруг гранул гликогена, формирование мелких миелиноподобных (остаточных) телец, выведение их в пространство Диссе.

На билиарных полюсах гепатоцитов в обеих зонах скапливались вторичные лизосомы, хорошо был развит пластинчатый комплекс Гольджи, который был представлен расширенными по периферии диктиосомами, содержавшими хлопьевидную субстанцию.

Через 3 сут после введения ЦФ значительным изменениям подвергалось микроциркуляторное русло печеночной дольки; регистрировалась гетерогенность эндотелиоцитов синусоидных капилляров, которая была обусловлена присутствием в эндотелиальной выстилке как некробиотически

измененных, так и активированных форм клеток. Активированные эндотелиоциты были гипертрофированными, в них хорошо была развита гранулярная цитоплазматическая сеть, присутствовали митохондрии, многочисленные окаймленные везикулы, микротрубочки, единичные мелкие липидные капли и остаточные тельца с хлопьевидным содержимым, сходные по структуре с таковыми в гепатоцитах. Некробиотически измененные эндотелиоциты были электронно-прозрачными, их плазматическая мембрана была неравномерно повреждена. Пространства Диссе были, как правило, заполнены хлопьевидной субстанцией, в которую были погружены микроворсинки гепатоцитов, здесь же встречались утолщенные пучки коллагеновых волокон, активированные формы клеток Купфера, лимфоцитов, плазмоцитов. Звездчатые клетки (липид-содержащие фибробласты) наблюдались редко.

Стереологический анализ гепатоцитов крыс Вистар после однократного введения циклофосфамида ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	Срок наблюдения	
		3 сут	14 сут
Объемная плотность, мм^3/см^3:			
митохондрий	305,8 ± 27,4	293,1 ± 16,6	232,2 ± 15,5*
гранулярной эндоплазматической сети	68,9 ± 4,8	80,2 ± 18,1	70,0 ± 12,4
липидных капель	18,2 ± 10,2	3,3 ± 2,1	15,1 ± 12,9
лизосом	1,5 ± 0,4	1,9 ± ,5	6,4 ± 5,4
цитоплазматического матрикса	612,8 ± 38,7	621,5 ± 13,8	676,3 ± 13,4
Поверхностная плотность (м^2/см^3):			
митохондрий	1,857 ± 0,168	1,779 ± 0,114	1,474 ± 0,050*
гранулярной эндоплазматической сети	2,600 ± 0,292	2,815 ± 0,356	2,697 ± 0,328
липидных капель	0,057 ± 0,031	0,015 ± 0,006	0,062 ± 0,059
лизосом	0,020 ± 0,006	0,020 ± 0,006	0,070 ± 0,056
Поверхностно-объемное отношение, м^2/см^3:			
митохондрий	6,1 ± 0,1	6,1 ± 0,5	6,4 ± 0,5
гранулярной эндоплазматической сети	39,0 ± 6,8	37,1 ± 2,9	39,5 ± 2,8
липидных капель	2,3 ± 0,8	4,5 ± 2,3	4,0 ± 1,3
лизосом	13,2 ± 1,1	10,3 ± 1,3	11,4 ± 1,2
Объемное отношение (число) гранулярной эндоплазматической сети к митохондриям	0,227 ± 0,010	0,282 ± 0,074	0,301 ± 0,051

Примечание. * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем.

Через 14 сут после введения ЦФ ультраструктурные изменения отдельных гепатоцитов усиливались. В гепатоцитах перипортальной зоны появлялись более обширные «поля» гликогена, среди которых встречались гетерогенные липидные включения. В таких участках гепатоцитов по периферии липидных капель формировалась плотная кайма из гранул гликогена, отмечалось скопление гранул внутри липидных включений. Тонкая структура митохондрий была изменена более существенно, отмечались деструкция крист и конденсация матрикса, часть органелл подвергалась миелиноподобной и осмиофильной дегенерации. Усиление деструкции митохондрий обусловливало снижение их объемной и поверхностной плотностей (соответственно на 24 и 21%, $p < 0,05$) (см. таблицу). Деструкция митохондрий, секвестрация гликогена и усиление аутофагоцитоза вызывали в некоторых гепатоцитах появление многочисленных очагов деградации (так называемого парциального некроза) цитоплазмы.

В этот срок наблюдения в гепатоцитах наблюдались многочисленные структурные элементы гиперплазированного комплекса Гольджи, диктиосомы которого, как правило, были расширены по периферии и содержали хлопьевидный материал. В составе везикулярной части комплекса Гольджи хорошо различались многочисленные окаймленные везикулы, что свидетельствовало об интенсификации синтетических процессов. На билиарных полюсах гепатоцитов концентрировались значительные скопления вторичных лизосом – отмечалось существенное увеличение их объемной и поверхностной плотности (соответственно на 327 и 250%) (см. таблицу).

Пространства Диссе, как правило, были сужены, в них встречались небольшие утолщенные пучки коллагеновых волокон и остаточные тельца. Эндотелиоциты синусоидов были представлены преимущественно активированными клетками, формировавшими цитоплазматические выросты и активно фагоцитирующими выводимые из гепатоцитов остаточные тельца, что придавало этим клеткам сходство с макрофагами. В некоторых случаях отмечалось тотальное разрушение эндотелиальной выстилки синусоидных капилляров в результате гибели эндотелиоцитов (их дегенерации) с активацией клеток Купфера и нейтрофилов. Отмечался фагоцитоз не только клеточного детрита и остаточных телец, но также и крупных апоптотических телец, которые по ультраструктурным особенностям можно было отнести к погибшим гепатоцитам. Важной особенностью циклофосфамидного поражения печени в этот срок была массивная распространенная обтурация синусоидных капилляров клетками Купфера, лимфоцитами, клеточным детритом.

В разрывах эндотелиальной выстилки появлялись активные звездчатые клетки, формирующие контакты с микроворсинками гепатоцитов и эндотелием. В цитоплазме звездчатых клеток была хорошо развита гранулярная цитоплазматическая сеть и регистрировались липидные включения. Отмечался активный периполез (внедрение лимфоцитов между гепатоцитами с нарушением их межклеточных контактов).

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что ЦФ вызывает значительные ультраструктурные изменения двух основных клеточных популяций печени – гепатоцитов и эндотелиоцитов синусоидов, а также реактивные изменения мигрирующих в пространство Диссе клеток Купфера, лимфоцитов, плазмоцитов. Основные структурные изменения гепатоцитов определяются выраженными повреждениями тонкой структуры митохондрий, транзиторными изменениями гранулярной цитоплазматической сети, значительной редукцией гладкой цитоплазматической сети, усилением аутофагоцитоза с образованием многочисленных субплазмалеммальных остаточных телец и секвестрацией гликогена. Одновременно в гепатоцитах отмечались признаки стимуляции регенераторных реакций, активации трансцитоза (гиперплазия и гипертрофия структурных элементов комплекса Гольджи), что отражает сложный характер воздействия ЦФ и его метаболитов на метаболические процессы в гепатоцитах. Для пространственной реорганизации гепатоцитов после воздействия ЦФ характерно снижение структурной плотности митохондрий и транзиторное изменение структурной плотности гранулярной цитоплазматической сети. Сходные деструктивные изменения митохондрий и гладкой цитоплазматической сети гепатоцитов, которые носили транзиторный характер, были обнаружены у крыс Вистар после однократного введения ЦФ в дозе 150 мг/кг [10].

В популяции эндотелиоцитов присутствовали клетки двух фенотипов – активированные и некробиотически измененные (дегенеративные). Внутриклеточная реорганизация активированных (неповрежденных) эндотелиоцитов после применения ЦФ была обусловлена интенсификацией обменных процессов и фагоцитоза, а также индукцией регенераторных процессов и появлением популяции новообразованных эндотелиоцитов, замещающих погибшие клетки. Значительные повреждения сосудистого русла с развитием тромбоэмболий после использования цитостатиков, в том числе и ЦФ, относятся к постоянно встречающимся осложнениям химиотерапии [7]. Метаболиты ЦФ (4-гидропероксициклофосфамид и акролеин) вызывают повреждение эндотелиоцитов в концентрации в 20 раз ниже, чем для гепатоцитов, вызывая истощение системы глутатиона (более чем на 95%) и индуцируя клеточную гибель [3]. ЦФ и его метаболиты оказывают не только повреждающее действие на эндотелиоциты синусоидов, но вызывают также повышение прокоагулянтных и снижение антикоагулянтных свойств крови, развитие венооккклюзионной болезни [5].

ЦФ в высоких и низких дозах вызывает сходные по динамике повреждения основных клеточных популяций печени, которые, как правило, носят транзиторный характер. При этом, по данным некоторых авторов, восстановление ультраструктуры гепатоцитов происходит раньше, чем клеток стромы [6]. В этом аспекте для минимизации токсических эффектов, активации цитопротекторных механизмов и снижения риска летальных осложнений крайне важной остается проблема оптимизации доз и режимов введения ЦФ и других цитостатиков с учетом их разного действия на различные клеточные популяции печени.

Список литературы

1. Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М., Толстикова Т.Г. Патоморфология мышечных клеток сердца при действии циклофосфамида и тритерпеноидов. – М.: Изд-во РАМН, 2009. – 272 с.

2. Морфогенез и гистостереологический анализ гепатопатии, индуцированной циклофосфамидом / Л.М. Непомнящих, О.П. Молодых, Е.Л. Лушникова, Ю.А. Сорокина // Бюл. экспер. биол. – 2010. – № 1. – С. 113–120.

3. Abraham P., Sugumar E. Increased glutathione levels and activity of PON1 (phenil acetate esterase) in the liver of rats after a single dose of cyclophosphamide: a defense mechanism? // Exp. Toxicol. Pathol. – 2008. – Vol. 59 (5). – P. 301–306.

4. High-dose busulfan and cyclophosphamide as a conditioning regimen for autologous peripheral blood stem cell transplantation in childhood non-hodgkin lymphoma patients: a long-term follow-up study / M. Andion, B. Molina, M. Gonzalez-Vicent et al. // J. Pediatr. Hematol. Oncol. – 2011. – Vol. 33(3). – P. 89–91.

5. Hepatic veno-occlusive disease associated with immunosuppressive cyclophosphamide dosing and roxithromycin / J. Beltinger, M. Haschke, P. Kaufmann et al. // Ann. Pharmacother. –2006. – Vol. 40. – P. 767–770.

6. De Leve L.D., Shulman H.M., Mc Donald G.B. Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease) // Semin. Liver Dis. – 2002. – Vol. 22. – P. 27–42.

7. Lee A.Y.T., Levine M.N. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes // Circulation. – 2003. – Vol. 107. – P. I17–I21.

8. Cyclophosphamide disrupt hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engrafment in rat liver / H. Malhi, P. Annamaneni, S. Slehria et al. // Hepatology. – 2002. – Vol. 36 (1). – P. 249–251.

9. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress / M.A. Rezvanfar, R.A. Sadrkhanlou, A. Ahmadi et al. // Hum. Exper. Toxicol. – 2008. – Vol. 27. – P. 901–910.

10. Sulkowska M., Sulkowski S., Skrzydlewska E. The effect of pentoxifylline on ultrastructure and antioxidant potential during cyclophosphamide-induced liver injury // J. Submicrosc. Cytol. Pathol. – 1999. – Vol. 31 (3). – P. 413–422.

Рецензенты:

Ляхович В.В., д.б.н., профессор, зав. отделом молекулярной биологии и директор НИИ молекулярной биологии и биофизики Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск;

Любарский М.С., д.м.н., профессор, зав. отделом клинической лимфологии и заместитель директора по научной и лечебной работе НИИ клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 22.08.2011.